



0200

P19771.P04

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant : Sususmu SEINO et al.

Serial No. : 09/617,099

Group Art Unit : Not yet known

Filed : July 14, 2000

Examiner : Not yet known

For : PROTEIN RIM2

**CLAIM OF PRIORITY**

Commissioner of Patents and Trademarks  
Washington, D.C. 20231

Sir:

Applicant hereby claims the right of priority granted pursuant to 35 U.S.C. 119 based upon Japanese Application No. 11-288372, filed October 8, 1999. As required by the Statute, a certified copy of the Japanese application is being submitted herewith.

Respectfully submitted,  
Sususmu SEINO et al.

Bruce H. Bernstein

Reg. No. 29,027

Reg No 31, 226

August 17, 2000  
GREENBLUM & BERNSTEIN, P.L.C.  
1941 Roland Clarke Place  
Reston, VA 20191  
(703) 716-1191

日本特許庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1999年10月 8日

出願番号

Application Number:

平成11年特許願第288372号

出願人

Applicant(s):

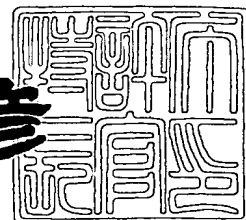
清野 進

日本ケミカルリサーチ株式会社

2000年 6月29日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特2000-3053960

【書類名】 特許願  
【整理番号】 P72-99  
【あて先】 特許庁長官殿  
【発明者】

【住所又は居所】 千葉県千葉市中央区千葉寺町 6 3 8 - 1 青葉の森の街  
2 2 - 1 - 4

【フリガナ】 セイ スム

【氏名】 清野 進

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県千葉市中央区矢作町 9 9 1 - 1 2 8 山和マンシ  
ョン 1 0 3

【フリガナ】 シバザキ タツオ

【氏名】 柴崎 忠雄

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県名古屋市中区昭和区山脇町 4 - 2 8 - 1 エクセル鶴  
舞 6 5

【フリガナ】 オノキ ノブアキ

【氏名】 尾崎 信暁

【特許出願人】

【識別番号】 595145094

【フリガナ】 セイ スム

【氏名又は名称】 清野 進

【特許出願人】

【識別番号】 000228542

【氏名又は名称】 日本ケミカルリサーチ株式会社

【代理人】

【識別番号】 100104639

【弁理士】

【氏名又は名称】 早坂 巧

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 063326

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9803334

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 タンパク質 R i m 2

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列表の配列番号 1 に示したアミノ酸配列を有するタンパク質。

【請求項 2】

配列表の配列番号 1 に示したアミノ酸配列において 1 個又は複数のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質であって、GDP/GTP 交換反応制御因子 II と相互作用する性質を有するタンパク質。

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 のタンパク質をコードするマウス遺伝子。

【請求項 4】

請求項 1 のタンパク質に対応する cDNA である、配列表の配列番号 2 に示した塩基配列を有する DNA。

【請求項 5】

配列表の配列番号 2 に示した塩基配列において 1 個または複数の塩基が欠失、置換、挿入又は付加された塩基配列を有し且つ請求項 1 又は 2 のタンパク質をコードするものである DNA。

【請求項 6】

請求項 4 又は 5 の DNA のコード領域の塩基配列を有する DNA。

【請求項 7】

請求項 4 の DNA の一部よりなる DNA 断片。

【請求項 8】

請求項 4 ないし 7 の DNA とハイブリザイズする DNA を含んでなるプローブ。

【請求項 9】

請求項 4 ないし 7 の何れかの塩基配列の部分配列よりなる、プライマー用 DNA 断片。

【請求項 10】

請求項 4 乃至 7 の何れかの DNA を保有する組換えベクター。

【請求項 1 1】

請求項 1 又は請求項 2 のタンパク質に対するモノクローナル又はポリクローナル抗体。

【請求項 1 2】

請求項 8 のプローブ又は請求項 1 1 の抗体を含むことを特徴とする、分泌不全又は脳神経系疾患用の診断薬。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、低分子量Gタンパク質 Rab3 と相互作用し Rab3 依存性のシナプスの小胞融合のレギュレーターとして働くといわれているタンパク質である Rim の新規アイソフォームであって、cAMP 結合能を有する GDP/GTP 交換反応制御因子II (GEFII) -すなわち cAMP センサー (cAMPS) -と特異的に相互作用するタンパク質である Rim2 に関する。更に詳しくは、本発明は、個体の恒常性維持に必須である細胞内小胞輸送及び分泌機構を解明し、内分泌疾患や神経疾患等の診断または予防、治療薬の開発に有用な新規のタンパク質である Rim2 及びこれをコードする遺伝子並びにタンパク質 Rim2 に対する抗体に関する。

【0 0 0 2】

本発明の過程において、タンパク質 Rim2 は主として内分泌組織並びに内分泌系及び神経内分泌系細胞で発現されていることが判明したことから、小胞融合の調節因子であると考えられる。GTP-Rab3/GEFII/Rim複合体は、cAMP 依存性かつタンパク質キナーゼ A (PKA) 非依存性に、神経細胞や内分泌細胞のエキソサイトシスの調節に関与しているものと推定される。

【0 0 0 3】

【従来技術】

生物細胞には単位膜で囲まれた小胞体などのオルガネラが存在し、それらの間の物質の移動は細胞内小胞輸送により行われている。膵β細胞や下垂体などの内分泌系細胞では、ペプチドタンパク質は、リボソームで合成されて小胞体に移動し、小胞体から小胞に乗ってゴルジ体を経て分泌顆粒となり細胞膜まで運ばれて

これと融合して、細胞外に分泌される。また、神経細胞においては、神経伝達物質を含んだシナプス小胞の前駆体がゴルジ体で形成され、軸索の微小管に運ばれてシナプスで貯蔵される。シナプス前膜が脱分極すると小胞がシナプス前膜と融合し、神経伝達物質が分泌放出される。このような、小胞と細胞膜との融合による形式で行われる分泌は、エキソサイトーシス（開口分泌）と呼ばれている。

## 【0004】

逆に、ホルモンなどの細胞増殖因子等種々の細胞外物質が細胞膜受容体に結合すると、その結合体は細胞内に取り込まれてエンドソームを形成するが、この形式による外環境物質の取り込みは、エンドサイトーシスと呼ばれている。

## 【0005】

エキソサイトーシスやエンドサイトーシスに共通して見られる出芽 (budding) 等の小胞形成、他の膜系に移動して結合するドッキングや融合等の現象は、Gタンパク質と呼ばれる低分子量の GTP 結合タンパク質により調節されている。このタンパク質は30種以上が知られており、別名 Rab ファミリーとして分類されているタンパク質群であって、細胞内小胞輸送系を制御している。

## 【0006】

現在、細胞内小胞輸送系に関して、Rab タンパク質がグアニンヌクレオチドジフォスフェイト (GDP) に結合して存在している細胞は静止状態にあり、Rab タンパク質に GEF活性を有するタンパク質が作用して GTP 結合型 Rab タンパク質に変換し、これに GTP が結合して GTP-Rab 複合体形成されると、これらが膜上の標的タンパク質に結合し、発芽、ドッキング、融合を引き起こすものと理解されている。

## 【0007】

神経細胞や内分泌細胞で見られるエキソサイトーシスにおいては、刺激と分泌作用との共役が重要な役割を果たしている [J.E.Rothman, Nature 372,55(1994) / T.C.Sudhof, Nature 375, 645 (1995)]。細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇はエキソサイトーシスの制御に重要であるが、他のシグナルもまた重要な役割を果たすことが知られている。cAMP (サイクリックアデノシン 3',5'-リン酸)/PKA (cAMP-依存性プロテインキナーゼA)シグナル経路は、多くの神経細胞、神経内分泌

細胞、内分泌細胞においてエキソサイトーシスを調節することが知られている。特に、cAMP は脳において神経伝達物質の放出を増大させることにより長期増強 (long-term potentiation) を媒介すると考えられている [R.D.Hawkins et al. Ann.Rev.Neurosci.16,625(1993)/ G.Lonart et al., Neuron 21,1141 (1998)]。また例えば、膵β細胞からのインスリン放出や耳下腺細胞からのアミラーゼ放出に関与するエキソサイトーシスも、cAMP によって調節されている [P.M.Jones and S.J., Persaud, Endocrine.Rev. 19,429 (1998)/ E.Renstrom,et al., J.P hysiol.502,105 (1997)/ K.Yoshimura, Biochim.Biophys.Acta 1402,171 (1998)]。

## 【0008】

cAMP は、エキソサイトーシスの過程に関連する調節タンパク質の PKA 依存性のリン酸化におけるその役割に加えて、神経細胞や非神経細胞のエキソサイトーシスの機構に直接に作用することも知られている [G.Lonart,et al., Neuron 21,1141 (1998)/ E.Renstrom,et al., J.Physiol.502,105 (1997)/ K.Yoshimura, Biochim.Biophys.Acta, 1402:171 (1998)]。

## 【0009】

膵β細胞系の ATP 感受性 $K^+$ チャネル ( $K_{ATP}$ ) を構成するスルホニルウレア受容体 [N.Inagaki et al. Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 91,2679 (1994)] に直接に共役する細胞内シグナル分子を、二種のタンパク質間相互作用を酵母細胞内で検出する方法である酵母ツーハイブリッドスクリーン (Yeast two-hybrid screen) で探索する過程で、ある cAMP センサータンパク質 (「CAMPS」と略記) が同定され、CAMPSが、2個の推定的 cAMP 結合ドメインとプレックストリン (Pleckstrin) ホモロジードメイン (PH ドメイン) やグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) のホモロジードメインを含むことが見出された。

## 【0010】

一方、この研究の過程で、二つの研究グループが独立して低分子量G結合タンパク質の一つであるRap1を活性化する cAMP 結合性タンパク質を報告し [J.de Rooij et al. Nature 396,474 (1998)/H.Kawasaki et al. Science 282,2275 (1998)]、更に、CAMPS タンパク質が cAMP-GEFII のマウス相同体であることが偶



然に明らかにされた [H.Kawasaki et al.Science 282, 2275 (1998)]。

【0011】

この様に、細胞内小胞輸送系についての機能の解明が進んではいるが、いまだ多くの部分が明らかにされていない。神経細胞や分泌系細胞が関係する種々の疾患の診断薬や治療薬を提供するために、これらの機能の解明を更に進めることが求められている。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】

従来は、cAMP-GEFII に一カ所の cAMP 結合ドメインの存在のみが示唆されていたが、本発明者等の研究により、cAMP-GEFII 配列と PKA の調節サブユニットの配列比較から、2つの推定的 cAMP 結合ドメイン(cAMP-A 及び cAMP-B)の存在が示唆された。図1は、cAMP 結合ドメインの配列比較を示しており、cAMP-GEFI I の cAMP 結合ドメイン A 及び B (それぞれ、cAMP-A 及び cAMP-B)、並びに P KA 調節サブユニット 1 $\alpha$  の cAMP 結合ドメイン A 及び B (それぞれ、RI $\alpha$ -A 及び RI $\alpha$ -B) が示されている。種々のドメイン中における不変の残基は黒い四角により示されている。

【0013】

図2に示されるように、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) と cAMP-A とからなる融合タンパク質は、 [ $^3$ H] cAMP と約10 $\mu$ M の解離定数(K<sub>d</sub>)をもって結合したしかしながら、同じ実験条件では GST-cAMP-B 融合タンパク質の [ $^3$ H] cAMP との結合は確認されていない。

図2は、cAMP-A への cAMP の結合を示す。GST-cAMP-A (黒丸) 又は GST-PKA RI $\alpha$  (白丸) を、種々の濃度の [ $^3$ H] cAMP (0~50 $\mu$ M) とインキュベートした。cAMP-A 及び PKA RI $\alpha$  についてのデータは、最大 cAMP 結合活性に対して標準化してある。K<sub>d</sub> 値は、cAMP-A 及び PKA RI $\alpha$  について、それぞれ、10.0 $\pm$ 2.3 $\mu$ M 及び 23.7 $\pm$ 0.6 nM である。

【0014】

cAMP-B ドメインでは423番目のアミノ酸残基であるグルタミン酸 (Glu) がリジン (Lys) に置換されているが、このグルタミン酸残基は cAMP の結合に重要

なものである。同等な変異を有する P K A 調節サブユニット (E-200-K) において、野性型と比較して急速に cAMP を解離することから、同様に、cAMP-B ドメインもまた cAMP を急速に解離している可能性がある。従って、cAMP-B ドメインへの cAMP が結合する可能性は、まだ残されている。

【0015】

CAMPS タンパク質すなわち cAMP-GEFII の標的分子が同定されればその生理学的な役割が示されるであろうことに着目し、本発明者等は、MIN6 cDNA ライブラリーの酵母ツーハイブリッドスクリーン法 (YTH 法) により cAMP-GEFII と相互作用する分子の同定を試みた。

【0016】

【課題を解決するための手段】

驚くべきことに、本発明者等は cAMP-GEFII が Rim (Rab3 に特異的な相互作用性分子: Rab3-interacting molecule: 以下、「Rim1」という。)の新規のアイソフォーム (「Rim2」と命名) と相互作用することを見出した。Rim1 タンパク質は、低分子量 G タンパク質 Rab3 のエフェクターであると推定されており、シナプス小胞融合の Rab3 依存性調節因子として働いているといわれている [Y. Wang et al. Nature 388, 593 (1997)]。

【0017】

本発明により配列決定された新規タンパク質である Rim2 は、全長1590個のアミノ酸残基からなり、ラット Rim1 と61.6%の同一性を示した。図3に示すように、Rim1 と Rim2 の間では、ジンクフィンガードメインと PDZ ドメイン及び C2 ドメインが高度に保存されていた。

【0018】

上記の研究結果に基づき、本発明は、配列表の配列番号1に示したアミノ酸配列を有するタンパク質を提供する。

【0019】

また本発明は、配列表の配列番号1に示したアミノ酸配列において1個又は複数のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質であって、GDP/GTP交換反応制御因子II と相互作用する性質を有するタン

パク質をも提供する。

【 0 0 2 0 】

更に本発明は、次の(1)又は(2)のタンパク質をコードするマウス遺伝子をも提供する。

- (1) 配列表の配列番号 1 に示したアミノ酸配列を有するタンパク質。
- (2) 該アミノ酸配列において 1 個又は複数のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質であって GDP/GTP 交換反応制御因子 II と相互作用する性質を有するタンパク質。

本明細書において、「1 個又は複数」のアミノ酸残基は、通常は例えば、数個（例えば 3、4 個）ないし 10 個である。

【 0 0 2 1 】

更に本発明は、配列表の配列番号 1 に示したアミノ酸配列を有する上記タンパク質に対応する cDNA である、配列表の配列番号 2 に示した塩基配列を有する DNA をも提供する。

【 0 0 2 2 】

更に本発明は、配列表の配列番号 2 に示した塩基配列において 1 個又は複数の塩基が欠失、置換、挿入又は付加された塩基配列を有し且つ上記の何れかのタンパク質をコードするものである DNA をも提供する。ここに、「1 個又は複数」の塩基は、通常は例えば数個（例えば 3、4 個）ないし 10 個である。そのような 1 個又は複数の塩基が欠失、置換、挿入又は付加された塩基配列の作成は、コドンの縮重に関する周知の知識を利用して、当業者は容易に行うことができる。

【 0 0 2 3 】

更に本発明は、上記 DNA 又は配列表の配列番号 2 に示した塩基配列を有する DNA のコード領域の塩基配列を有する DNA をも提供する。

【 0 0 2 4 】

更に本発明は、これらの DNA の一部よりなる DNA 断片をも提供する。

【 0 0 2 5 】

更に本発明は、上記の各塩基配列の何れかよりなる DNA とハイブリダイズする DNA を含んでなるプローブをも提供する。

【 0 0 2 6 】

更に本発明は、上記の各塩基配列の何れかの部分配列よりなる、プライマー用 DNA 断片をも提供する。

【 0 0 2 7 】

更に本発明は、上記の何れかの DNA を保有する組換えベクターをも提供する。

【 0 0 2 8 】

更に本発明は、前記タンパク質に対するモノクローナル又はポリクローナル抗体をも提供する。

【 0 0 2 9 】

更に本発明は、上記プローブ又は抗体よりなる、ヒト用診断薬をも提供する。該診断薬は、下垂体や視床下部や膵β細胞や耳下腺などの分泌系の分泌不全などの疾患や脳神経系疾患などの検査に役立つ。

【 0 0 3 0 】

本発明はまた、上記の何れかの疾患の治療薬をも提供する。

【 0 0 3 1 】

組換えDNA技術により、種々の変異体の作製が可能である。最初に種々の化学的及び酵素的方法を用いて DNA のクローン断片に変異を生じさせることができ、得られた変異型の DNA につき DNA 配列分析を行い、利点を持つ特定の変異体を選び出す。この方法で種々の変異体を、その表現型に関係なく、システムティックに作製することができる。一般に用いられる変異型クローンの作製方法は、以下の通りである。

【 0 0 3 2 】

1. オリゴヌクレオチドを用いて直接に DNA 配列に置換、欠損、挿入、付加を起こさせることができる。この方法によれば、DNA の小さな領域に多くの変異を起こさせることが可能である。

2. より長いオリゴヌクレオチドを用いて所望の遺伝子の合成が可能である。

3. 部位特異的変異作製法 (Region-specific Mutagenesis) を用いて、大きな DNA 領域 (1~3 kb) に所望の変異体を作製可能である。

4. DNA のリンカースキャニング変異体作製法 (Linker-scanning Mutagenesis) は相対的に小さなDNA領域 (4-10 bp) にクラスター点変異を作製するのに適した方法である。

5. PCRも、直接的な変異体作製法として利用できる。

[参考文献: Current protocols in molecular biology. 3 vols. Edited by Ausubel F.M. et al., John Wiley & Sons, Inc., Current Protocols., Vol.1, Chapter 8: Mutagenesis of cloned DNA, pages 8.0.1-8.5.10]。

【0033】

これらの方法で得られた種々の変異型を含む所望の遺伝子を発現することの可能なプラスミドやベクターの作製方法も、当業者に周知である。すなわち、制限酵素とリガーゼとの組合わせを用いて、所望の遺伝子を含んだDNAを発現ベクター DNA に挿入することにより、所望の遺伝子を含んだ組換えプラスミドを容易に構築することができる。得られた組換えプラスミドを種々の細胞に導入することにより細胞をトランスフェクトし、形質転換細胞を作製することができる。細胞としては、大腸菌などの原核細胞から、酵母や昆虫、植物や動物細胞も利用することができる。

[参考文献: Vectors essential data. Gacesa P. and Ramji D.P. 166 pages. BIOS Scientific Publishers Limited 1994., John Wiley & Sons in association with BIOS Scientific Publishers Ltd. Expression vectors, pages 9-12.]

【0034】

宿主細胞への組換えプラスミドの導入は、塩化カルシウム法やエレクトロポレーション法により行うことができる。塩化カルシウム法は効率的なトランスホメーションを与え、特別な装置を必要としない。より高い効率を求めるならば、エレクトロポレーションが用いられるべきである。

[参考文献: Current protocols in molecular biology. 3 vols. Edited by Ausubel F.M. et al., John Wiley & Sons, Inc., Current Protocols. Vol.1, unit 1.8: Introduction of plasmid DNA into cells, pages 1.8.1-1.8.10]

【0035】

動物細胞系で通常行われるトランスフェクションには、一過性のものと安定で永久的なものとの2通りが知られている。一過性のトランスフェクションでは、形質転換細胞を1〜4日間培養してトランスフェクトした遺伝子を転写、複製し、細胞を回収して DNA 分析を行う。代わりに、多くの研究では、トランスフェクト遺伝子を染色体遺伝子に組み込む安定型の形質転換系を作製している。トランスフェクション法としては、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、リポソーム触媒法などが用いられる。

[参考文献: Current protocols in molecular biology. 3 vols. Edited by Ausubel F.M. et al., John Wiley & Son, Inc., Current Protocols. Vol.1, Chapter 9: Introduction of DNA into mammalian cells, pages 9.0.1-9.17.3.]

【0036】

本発明の Rim2 遺伝子について、それがコードするタンパク質（ポリペプチド）及びその断片や相同体に対するポリクローナルやモノクローナル抗体の作製も、当該分野において周知の技術を用いて容易に行うことができる。作製された抗体は研究試薬や本 Rim2 遺伝子の関連する疾患の診断薬として利用可能である。また、得られた抗体は抗体カラムの作製、免疫沈殿法、更にはウエスタンブロッティングによる抗原の同定その他に広く利用できる。

【0037】

本発明の Rim2 遺伝子がコードするタンパク質に対する mg レベルのモノクローナル抗体の一般的作製法は、次の通りである。すなわち、抗原タンパク質をマウスに接種して免疫し、十分な抗体タイターを示すマウスから脾臓を除去する。脾臓細胞を分離して脾臓 B 細胞を選択し、B 細胞起源の骨髓腫細胞に融合し、抗体を分泌するハイブリドーマ細胞を構築し、ハイブリドーマ細胞から分泌されたモノクローナル抗体を、細胞培養液からアイニティーカラム、イオン交換法、ゲルろ過法等を用いて精製する。また、一般的な方法で本発明物質のポリクローナル抗体をも製造できる。すなわち、免疫動物としては兎、馬、マウス、モルモットなどを用い、当業者に既知の種々のスケジュールで抗原タンパク質を接種して免疫し、採血した血清から免疫グロブリン Gなどを単離する。

[参考文献: Current protocols in molecular biology. 3 vols. Edited by Ausubel F.M. et al., John Wiley & Son, Inc., Current Protocols. Vol.1, Chapter 9: Introduction of DNA into mammalian cells, pages 9.0.1-9.17.3.]

suel F.M.et al. John Wiley & Sons,Inc., Current Protocols. Vol.2, chapter 11: Immunology, pages 11.0.1-11.16.13]

【0038】

【発明の実施の形態】

本発明者等は、cAMP-GEFII と Rim2 間の相互作用の特性を評価するために、グルタチオンビーズ上に固定化した GST-Rim2 融合タンパク質に対する FLAG-cAMP-GEFII タンパク質の結合を調べた。

【0039】

すなわち、FLAG 標識 cAMP-GEFIIでトランスフェクトした COS-1 細胞、MIN6 細胞又はマウス脳ホモジネートからの溶解物を、GST-Rim1、GST-Rim2、又はGST 単独への結合について評価した。cAMP-GEFII は、抗 FLAG 抗体によって（図4、左）又は cAMP-GERII に対する抗体によるイムノブロッティングによって（図4、中央及び右）、それぞれ検出された。これらの結果は、cAMP-GEFII タンパク質が GST-Rim2 タンパク質と相互作用することを明らかにしている。同様にまた、GST-Rim1タンパク質もまたマウス脳のホモジネート中において cAMP-GEFII に結合した（図4、右）。これらの結果は、cAMP-GEFIIタンパク質が Rim1 及び Rim2 と相互作用することを確認するものである。

【0040】

図5は、ラットの各組織中並びに内分泌細胞及び神経内分泌細胞由来細胞系における cAMP-GEFII、Rim1、及び Rim2 のノーザンブロット分析の結果を示している。サンプルとして、種々の組織及び細胞系からの RNA の10 $\mu$ g（膵島では5 $\mu$ g）を用いた。ハイブリダイゼーション及び洗浄は、標準の条件下に行った。大脳及び小脳の Rim2 mRNA ブロット分析における弱いシグナルは、用いた Rim1 cDNA プローブとの交差ハイブリダイゼーションのためである。図5は、Rim2 mRNAが下垂体や膵ランゲルハンス島、MIN6 細胞、PC12 細胞などの内分泌組織や内分泌及び神経内分泌組織由来細胞系に主として発現されることを明らかにしている。脳内の Rim2 mRNA は、逆転写酵素 PCR によって検出した（データは示さず）。これに対し、同様な分析で Rim1 mRNA は、大脳、小脳や下垂体に発現することが見出された。

## 【 0 0 4 1 】

Rim1 と Rim2 の主な転写体は、Rim1 で 6.4 k b であり、Rim2 で 7.2 k b 及び 5.4 k b であるが、おそらく選択的スプライシング (alternative splicing) によるものと思われる、幾つかの主要でない転写物も見出される。

## 【 0 0 4 2 】

調節性エキソサイトーシスの起こることの知られている組織及び細胞では、一般に、cAMP-GEFII の mRNA は Rim1 mRNA 又は Rim2 mRNA と共発現されている。図 6 は、マウス脳及び下垂体における Rim1 及び Rim2 の所在を示す in situ ハイブリダイゼーションの結果を示す。図において： (a) cAMP-GEFII； (b) Rim1； (c) Rim2； (d) 下垂体。スケールバーは、1 mm を示す。略号は：Cb=大脳、Cp= caudoputamen、Cx=皮質、Hi=海馬、Ob=嗅球、Po=橋、Th=視床。

## 【 0 0 4 3 】

Rim2 mRNA は小脳皮質のみに発現が見出され、Rim1 mRNA は大脳皮質、海馬（特に CA3 及び歯状回）、嗅球、小脳皮質に発現されている。また、cAMP-GEFII の mRNA 分布は脳における Rim1 mRNA のそれと大体において重なる。また、Rim2 mRNA と cAMP-GEFII mRNA とは、下垂体前葉において共発現していることが確認された。

## 【 0 0 4 4 】

Rim1 は低分子量 G タンパク質である Rab3 エフェクターであるといわれている [Y.Wang, et al., Nature 388, 593 (1997)]。本発明者等は、酵母ツーハイブリッドアッセイを用いて、Rim2 が、Rim1 と同様に、活性型の Rab3A (Q81L) と相互作用することを見出した (図 7)。図 7 は、酵母ツーハイブリッドアッセイの結果を示し、Rim1、Rim2、又はラブフィリン 3 と野性型 Rab3A 又は持続的活性な Rab3A (Q81L) との相互作用を種々の組み合わせで、液状  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性のトランス活性化によって測定したものである。

## 【 0 0 4 5 】

加えて、固定化 GST-Rim2 は Rab3A の GTP  $\gamma$  S 結合型にのみ結合した (図 8)。図 8 は、in vitro での Rim1 又は Rim2 と Rab3A との相互作用を示しており、Rab3A の GTP  $\gamma$  S 結合又は GDP  $\gamma$  S 結合型を、グルタチオンビーズ上に固定



化した GST-Rim1 (残基1-201) 及び GST-Rim2 (残基1-345) と共に、それぞれインキュベートすることにより得られた結果である。Rab3A は、抗 Rab3A 抗体によるイムノブロッティングにより検出した。これらの結果は、Rim2 タンパク質が、Rim1 タンパク質と同様に、Rab3A の GTP 活性型に結合することを確認するものである。

【0046】

cAMP-GEFII と Rim2 タンパク質の相互作用から、cAMP-GEFII が、調節性エキソサイトーシスに関与することが強く示唆される。その機能的役割を明らかにするために、成長ホルモン (GH) と cAMP-GEFII を共トランスフェクトした PC12 細胞における  $\text{Ca}^{2+}$  依存性の分泌に対する cAMP の影響を調べた。

【0047】

PC12 細胞は内因性に Rim2 を発現するが、cAMP-GEFII を発現しないことから、外因性に導入された cAMP-GEFII は内因性の Rim2 と複合体を形成すると推定される。

【0048】

図9は、GH 及び cAMP-GEFII で共トランスフェクトした PC12 細胞からの高  $\text{K}^+$  誘導 GH 分泌の時間的推移を示すグラフであり、図10は、トランスフェクト PC12 細胞からの GH 分泌に対するフォルスコリンの影響を示すグラフである。フォルスコリン ( $50 \mu\text{M}$ ) は、低  $\text{K}^+$  ( $4.7\text{mM}$ ) 又は高  $\text{K}^+$  ( $60\text{mM}$ ) 溶液によるインキュベーションの10分前に添加した。各記号は次のものを示す： 基底 (低  $\text{K}^+$  誘導) 分泌：cAMP-GEFII トランスフェクト体 (黒三角)、 $\beta$ -ガラクトシダーゼトランスフェクト体 (対照) (白三角)： 高  $\text{K}^+$  誘導分泌：cAMP-GEFII トランスフェクト体 (黒丸)、 $\beta$ -ガラクトシダーゼトランスフェクト体 (対照) (白丸)。値は、総細胞 GH 量に対する培地中に放出された GH 量のパーセントとして表されている。

【0049】

この共トランスフェクトした PC12 細胞において、図9に示す様に cAMP-GEFII は  $\text{Ca}^{2+}$  依存性 ( $60\text{mM}\text{K}^+$ ) の共トランスフェクトした GH の分泌を、対照と比較して変化させなかった、しかし、フォルスコリン ( $50 \mu\text{M}$ ) 誘導による  $\text{Ca}^{2+}$  依

存性の GH 分泌は有意に促進された (図 10)。フォルスコリンは、主としてアデニル酸シクラーゼに作用して細胞内の cAMP 濃度を上昇させる働きを有する。

cAMP-GEFII はまた 8-Br-cAMP (1 mM) 誘導性の  $\text{Ca}^{2+}$  依存性 GH 分泌を高めた (cAMP-GEFII-トランスフェクト体,  $34.9 \pm 1.3\%$ ; 対照,  $25.1 \pm 1.8\%$ ,  $n=9$ ,  $P<0.001$ )。

#### 【0050】

図 11 は、種々の変異 cAMP-GEFII でトランスフェクトした PC12 細胞からのフォルスコリン誘導 GH 分泌を示すグラフであり、各変異体 cAMP-GEFII について、15分間のインキュベーションの間における、フォルスコリン ( $50 \mu\text{M}$ ) 誘導 GH 分泌の (高  $\text{K}^+$  存在下) の増加分を、野性型 cAMP-GEFII (100%) に対するパーセントで示している。図において: WT=野性型 cAMP-GEFII、T810A=変異型 cAMP-GEFII (T810A)、G114E、G422D、二重変異体 cAMP-GEFII (G114E, G422D)

#### 【0051】

フォルスコリン誘導性の GH 分泌は、潜在的 PKA リン酸化部位がアミノ酸置換により破壊された変異型の cAMP-GEFII (T810A) においては影響を受けなかった (図 11)。加えて、フォルスコリン誘導性の GH 分泌は、両方の cAMP 結合部位を破壊した変異型の cAMP-GEFII (G114E, G422D) の場合には、野性型に比較して約 40% まで減少した。

#### 【0052】

これらの結果は、cAMP が、PKA によるリン酸化の関与を伴うことなしに cAMP-GEFII の結合によって  $\text{Ca}^{2+}$  依存性の GH 分泌を促進することを示している。

#### 【0053】

図 12 は、cAMP-GEFII でトランスフェクトした PC12 細胞からのフォルスコリン誘導 GH 分泌に対する H-89 の影響を示すグラフである。H-89 ( $10 \mu\text{M}$ ) は、フォルスコリン ( $50 \mu\text{M}$ ) 処理の 10 分前に、インキュベーション緩衝液に添加した。cAMP-GEFII トランスフェクト PC12 細胞及び  $\beta$ -ガラクトシダーゼトランスフェクト PC12 細胞の双方において、H-89 ( $10 \mu\text{M}$ ) による処理は、高  $\text{K}^+$

誘導 GH 分泌を低下させた。データは、3～5回の独立した実験（A～D）より得られたものである。値は、平均±平均偏差（SEM）を示す（ $P<0.01$ ）。

【0054】

重要なことに、cAMP-GEFII でトランスフェクトし PKA 阻害剤である H-89 で処理した PC12 細胞からのフォルスコリン誘導性  $\text{Ca}^{2+}$  依存性 GH 分泌は、コントロール細胞と比較して有意に高かった。このことは cAMP-GEFII が cAMP 依存性且つ PKA 非依存性のエキソサイトーシスを媒介することを示している。

【0055】

本発明者等は cAMP-GEFII の生理的な関連性を確かめるために、分泌における内因性 cAMP-GEFII の役割を検討した。膵β細胞でのインスリン分泌において、cAMPは、PKA 依存性の機構及び PKA 非依存性の機構によってエキソサイトーシスを刺激するといわれている [M.Prentki, F.M.Matschinsky, *Physiol.Rev.*67,185 (1987)/ P.M.Jones, S.J.Persaud, *Endocrine.Rev.*19,429 (1998)]。

【0056】

16.7mMの高濃度グルコース条件下では、cAMP-GEFII に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドで処理された MIN6 細胞における 8-Br-cAMP 誘導性インスリン分泌は有意に減少し(対照オリゴヌクレオチド処理 MIN6 細胞からの分泌の  $7.5\pm 2.3\%$ ,  $n=27$ ,  $P<0.005$  )、cAMP-GEFIIが生来の細胞において cAMP 依存性のエキソサイトーシスに関与していることを示唆した。

【0057】

Rab3 タンパク質はエキソサイトーシスの最終段階に関与している。構造的に関連しているタンパク質であるラプフィリン 3 (rabphilin3) [H.Shirataki et al., *Mol.Cell.Biol.* 13,2061 (1993)] と Rim1 はいずれも Rab3Aに結合し、このことは複数の Rab3A エフェクターが、形質膜への小胞の結合及び融合の引き金として作用し得ることを示唆している。

【0058】

本発明の過程で、cAMP センサーである cAMP-GEFII は、Rab3 エフェクターである Rim2 と相互作用することにより cAMP誘導性の  $\text{Ca}^{2+}$  依存性エキソサイトーシスを媒介することが見出された。

【0059】

従来の研究により、分泌過程に関連した PKA によるタンパク質リン酸化の役割に加えて、cAMP が直接にエキソサイトーシスに作用することが示唆されている [G.Lonart, et al., Neuron 21, 1141 (1998)/ E.Renstrom, et al., J.Physiol. 502, 105 (1997)/ K.Yoshimura, et al., Biochim.Biophys.Acta 1402, 171 (1998)]。膵β細胞でも、cAMP による PKA 依存性並びに PKA 非依存性のインスリン放出促進があるといわれている [E.Renstrom, et al., J.Physiol. 502, 105 (1997)]。また、耳下腺細胞では、cAMP はおそらく直接にアミラーゼ放出を刺激していると推定されている。加えて、最近の研究は、cAMP が脳のグルタミン酸放出においてもエキソサイトーシス機構に部分的であるが直接に作用して促進を示すことを示唆している [G.Lonart, et al., Neuron 21, 1141 (1998)]。

【0060】

しかしながら、ラブフィリン3と Rim1、は脳のほとんどのシナプスに普遍的に発現されているが [C.Li et al., Neuron 13, 885 (1994)]、cAMP に促進されるグルタミン酸放出は、脳の海馬において CA1 領域ではなく CA3 領域のシナプトソームで生じており、これは cAMP-GEFII と Rim1 が主として CA3 において共発現していることと符合する発見である。

【0061】

従って、分泌過程において、PKA 依存性リン酸化に加えて、cAMP は、図13に概念的に示したように、cAMP-GEFII (cAMPセンサーである) と Rim (Rab3エフェクターである) の複合体に直接に作用することによって、神経細胞や神経内分泌細胞及び内分泌細胞において、調節性エキソサイトーシスを PKA 非依存的に促進するものであろう。

【0062】

これらのことは、本発明の Rim2 も、神経細胞や分泌細胞のエキソサイトーシスの調節において重要な役割を果たしていることを示している。

【0063】

【実施例】

以下、実施例を参照して本発明における操作の具体的手順を示すことにより、

本発明を更に詳細に説明する。

【0064】

<CAMPS (cAMP-GEFII) の cDNA の配列決定>

マウスのインスリン分泌細胞系 MIN6 より、ベクター pVP16 中にプラスミド cDNA ライブラリーを作製した。酵母ツーハイブリッド誘惑 (bait) ベクターを、膵β細胞K<sub>ATP</sub>チャネルのサブユニットであるラット SUR1 の部分アミノ酸配列(598-1003: Genbank 受入番号 L40624)をコードする DNA 断片を用いてプラスミド pBTM116 中に構築した。

【0065】

プラスミド MIN6 cDNA ライブラリーの酵母ツーハイブリッドスクリーンを、K. Kotake et al., J. Biol. Chem. 272, 29407 (1997)に記載の方法で行った。cAMP センサーである CAMPS の部分配列(187-730配列)をコードする餌 (pray) クローンを単離した。マウスの CAMPS の全長 cDNA は λMIN6 cDNA ライブラリーから得られた [N. Inagaki et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91, 2679 (1994)]。マウスのCAMPS (cAMP-GEFII) のヌクレオチド配列を Genbank に受入番号 AB021132 として預託した。

【0066】

<GST-融合タンパク質の製造及び試験>

cAMP-A(アミノ酸残基、43-153)、cAMP-B(アミノ酸残基、357-469)、及びラット PKA 調節サブユニット (RIα) (全長) を、プラスミド pGEX-4T-1 (Amersham-Pharmacia)を用いてGST 融合タンパク質として発現させ、メーカーのマニュアルに従って精製した。cAMP 結合アッセイを、R.A. Steiberg, et al., J. Biol. Chem. 262, 2664 (1987)に記載の方法を幾分修正して用いることにより行った。

【0067】

要するに、GST 融合タンパク質(1 μg)を、種々の濃度の [<sup>3</sup>H] cAMP、50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH6.8)、150 mM NaCl、1 mM EDTA、5 mM 2-メルカプトエタノール、0.5 mg/ml 牛血清アルブミンを含み、40 mM 非標識 cAMP を含む又は含まない結合緩衝液 (200 μl) 中、氷上で2時間インキュベートした。

【0068】

# <YTH 法による相互作用分子の検討>

酵母ツーハイブリッド誘惑ベクターを、マウスの cAMP-GEFII の全長 cDNA を用いてプラスミド pBTM116 中に構築した。Rim2 の部分配列（アミノ酸残基 53-863）をコードする餌クローンをプラスミド MIN6 cDNA ライブラリーから単離した。Rim2 の全長 cDNA はλ MIN6 cDNAライブラリーから得た。

【0 0 6 9】

## <Rim2 と cAMP-GEFII との相互作用の検討：I>

「GST-融合タンパク質の製造及び試験」の部に記載の方法に準じて、Rim2 のアミノ酸配列（アミノ酸残基 538-863）を GST 融合タンパク質として発現させ、精製した。cAMP-GEFII の cDNA の全長を、プラスミド pFLAG-CMV-2(Sigma)中にサブクローンした。得られた構築物をリポフェクタミン (LipofectAMINE: Life Technologies)を用いて COS-1 細胞にトランスフェクトした。この COS-1 変換細胞の溶解物を、グルタチオンビーズ上に固定化した GST-Rim2 と2時間、4℃にてインキュベートした。得られた複合体を蒸留水で洗い、SDS-PAGE で分離し、抗 FLAG M2 抗体 (Sigma) を用いてイムノブロッティングを行った。

【0 0 7 0】

## <Rim2 と cAMP-GEFII との相互作用の検討：II>

MIN6 細胞の溶解物を GST-Rim 2とインキュベートし、cAMP-GEFIIと Rim2 の相互作用を、IgG 抗体としてマウス cAMP-GEFII のカルボキシル末端（アミノ酸配列1001-1011, QMSHRLEPRRP）に対する抗体を用いて、「Rim2 と cAMP-GEFII との相互作用の検討：I」に記載の方法に準じて評価した。

【0 0 7 1】

## <Rim1 と cAMP-GEFII との相互作用の検討>

「GST-融合タンパク質の製造及び試験」の部に記載の方法に準じて、Rim1 の部分配列(530-806)を GST 融合タンパク質として発現させ、精製した。3匹のマウスからの脳ホモジェネートをグルタチオンビーズ上に固定化した GST-Rim1 と、4℃にて終夜インキュベートした。cAMP-GEFII を、「Rim2 と cAMP-GEFII との相互作用の検討：II」の部の記載に準じて検出した。

【0 0 7 2】

# <ラット組織におけるノーザンブロット分析>

プローブとして、マウス cAMP-GEFII (ヌクレオチド配列 606-2237)、ラット Rim1 (1035-1491)、及びマウス Rim2 (586-1490) cDNA を用いて、ラットの各種組織におけるノーザンブロット分析を行った。

【0073】

# <マウス脳の in situ ハイブリダイゼーション>

マウス脳につき、in situ ハイブリダイゼーションを、J.Tanaka, M.Murate, C. Z.Wang, S.Seino, T.Iwanaga, Arch.Histol.Cytol.59,485 (1996)に記載された方法で行った。

【0074】

マウス cAMP-GEFII と Rim2 に用いられたアンチセンスオリゴヌクレオチドプローブ (45 mer) は、それぞれ核酸配列 2746-2790 及び 1376-1420 の領域に相当する。

【0075】

Rim1 に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドのためには、Rim1 cDNA が部分的にマウス脳からクローニングされた。用いられたプローブは； 5'-ttgcgctc actcttctggcctcccttgccattctgctctgaaagc-3' である。

【0076】

# <Rim2 と Rab3A との相互作用の検討>

「YTH 法による相互作用分子の検討」の部に記載の方法に準じて、野性型のマウス Rab3A と構成的に活性なウシ Rab3A (Q81L) との全長 cDNA を、それぞれ酵母の誘惑ベクター pBTM116 中にクローニングした。

【0077】

ウシのラブフィリン 3 (アミノ酸残基 1-283)、ラット Rim1 (アミノ酸配 1-204)、マウス Rim2 (アミノ酸残基 1-345) のジンクフィンガードメインのヌクレオチド配列を餌ベクター pVP16 にクローニングした。液体培養の  $\beta$ -ガラクトシダーゼの活性は、メーカー (Clontech) のマニュアルに従って行った。それらの活性値は、各形質転換細胞からの 3 つの独立したクローンから得られ、OD<sub>600nm</sub>での吸光度に基づいて細胞数について標準化した。

## 【0078】

脂質修飾した Rab3A を、Rab3A を発現している Sf9 細胞の膜画分から精製した。ラットの Rim1 の（アミノ酸残基 1-204）とマウスの Rim2（アミノ酸残基 1-34）を、GST 融合タンパク質として発現させ、これを精製した。Rab3A の GTP  $\gamma$  S 結合型又は GDP  $\beta$  S の結合型を 4℃にて90分、グルタチオンビーズ上に固定化した GST-Rim1 又は GST-Rim2 と共にインキュベートした。Rab3A は、抗 Rab 抗体を用いたイムノブロッティングで検出した。

## 【0079】

## ＜トランスフェクト PC12 細胞における GH 分泌の検討＞

トランスフェクトした PC12 細胞からの GH 分泌を、K. Korake et al., J. Biol. Chem., 272:29407(1997)の記載に準じて評価した。野性型の cAMP-GEFII、変異型の cAMP-GEFII(T810A)、二重変異型の cAMP-GEFII (G114E, G422D) に対するそれぞれの発現プラスミドベクター (pSR $\alpha$ ) を調製した。対照としては  $\beta$ -ガラクトシダーゼを用いた。PC 細胞に GH 発現ベクター (pXGH5/Nichols Institute) 及び上記のベクターにより、LipofectAMINEを用いてトランスフェクトした。

## 【0080】

PC12 細胞を低濃度 K<sup>+</sup> (4.7 mM) 又は高濃度 K<sup>+</sup> (60 mM) で、またフォルスコリン (50  $\mu$ M) の有無若しくは 8-ブロムアデノシン-3',5'-サイクリックモノフォスフェイト (8-Br-cAMP) (1 mM) の存在下又は非存在下にインキュベートした。フォルスコリンまたは 8-Br-cAMP は、低濃度または高濃度カリウム溶液でインキュベーションする10分前に加えられた。いくつかの実験では、PKA インヒビター H-89 (10  $\mu$ M) が、フォルスコリン刺激の10分前に加えられた。

## 【0081】

## ＜cAMP 依存性エキソサイトーシスにおける cAMP-GEFII の役割の検討＞

MIN6細胞でのcAMP-GEFIIの合成を妨害するために、マウスの cAMP-GEFII（核酸配列の104-119に相当する領域）に対するアンチセンスのフォスフォロチオエート置換オリゴ DNA (16 mer) と、対照オリゴ DNA (5'-acctacgtgactacgt-3') とを合成した (BIOGNOSTIK)。



【 0 0 8 2 】

MIN6 細胞を、インスリン実験の24時間前に、アンチセンスオリゴ DNA 又は対照オリゴ DNA の各 4  $\mu$ M の濃度で処理した。アンチセンスオリゴ DNA の効率は、一過性トランスフェクションにより cAMP-GEFII を過剰に発現するアンチセンスオリゴ DNA 処理 MIN6 細胞につき、抗 cAMP-GEFII 抗体を用いて、イムノブロッティングにより評価した。アンチセンスオリゴ DNA 処理された MIN6 細胞における cAMP-GEFII のレベルは著しく低下した。これらの MIN6 細胞での 8-Br-cAMP (1 mM) に対するインスリン分泌応答は、高グルコース濃度 (16.7 mM) において分析した。5 回の別個の実験を行い、インスリンの測定は、T.Gonoi et al., J.Biol.Chem.269,16989 (1994) に記載の通りに行った。

【 0 0 8 3 】

【配列表】

Sequence Listing

<110> Seino, Susumu; JCR Pharmaceuticals Co., Ltd.

<120> Protein Rim2

<130> P72-99

<160> 4

<210> 1

<211> 1590

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Met Ser Ala Pro Leu Gly Pro Arg Gly Arg Pro Ala Pro Thr Pro Ala

1

5

10

15

Ala Ser Gln Pro Pro Pro Gln Pro Glu Met Pro Asp Leu Ser His Leu

20

25

30

Thr Glu Glu Glu Arg Lys Ile Ile Leu Ala Val Met Asp Arg Gln Lys

35

40

45

Lys Glu Glu Glu Lys Glu Gln Ser Val Leu Lys Ile Lys Glu Glu His

50

55

60

Lys Ala Gln Pro Thr Gln Trp Phe Pro Phe Ser Gly Ile Thr Glu Leu

65

70

75

80

Val Asn Asn Val Leu Gln Pro Gln Gln Lys Gln Pro Asn Glu Lys Glu

85

90

95

Pro Gln Thr Lys Leu His Gln Gln Phe Glu Met Tyr Lys Glu Gln Val

100

105

110

Lys Lys Met Gly Glu Glu Ser Gln Gln Gln Gln Glu Gln Lys Gly Asp

115

120

125

Ala Pro Thr Cys Gly Ile Cys His Lys Thr Lys Phe Ala Asp Gly Cys

130

135

140

Gly His Asn Cys Ser Tyr Cys Gln Thr Lys Phe Cys Ala Arg Cys Gly

145

150

155

160

Gly Arg Val Ser Leu Arg Ser Asn Lys Val Met Trp Val Cys Asn Leu

165	170	175
Cys Arg Lys Gln Gln Glu Ile Leu Thr Lys Ser Gly Ala Trp Phe Tyr		
180	185	190
Asn Ser Gly Ser Asn Thr Leu Gln Gln Pro Asp Gln Lys Val Pro Arg		
195	200	205
Gly Leu Arg Asn Glu Glu Ala Pro Gln Glu Lys Lys Ala Lys Leu His		
210	215	220
Glu Gln Pro Gln Phe Gln Gly Ala Pro Gly Asp Leu Ser Val Pro Ala		
225	230	235
Val Glu Lys Gly Arg Ala His Gly Leu Thr Arg Gln Asp Thr Ile Lys		
245	250	255
Asn Gly Ser Gly Val Lys His Gln Ile Ala Ser Asp Met Pro Ser Asp		
260	265	270
Arg Lys Arg Ser Pro Ser Val Ser Arg Asp Gln Asn Arg Arg Tyr Glu		
275	280	285
Gln Ser Glu Glu Arg Glu Asp Tyr Ser Gln Tyr Val Pro Ser Asp Gly		
290	295	300
Thr Met Pro Arg Ser Pro Ser Asp Tyr Ala Asp Arg Arg Ser Gln Arg		
305	310	315
		320

Glu Pro Gln Phe Tyr Glu Glu Pro Gly His Leu Asn Tyr Arg Asp Ser  
325 330 335

Asn Arg Arg Gly His Arg His Ser Lys Glu Tyr Ile Val Asp Asp Glu  
340 345 350

Asp Val Glu Ser Arg Asp Glu Tyr Glu Arg Gln Arg Arg Glu Glu Glu  
355 360 365

Tyr Gln Ala Arg Tyr Arg Ser Asp Pro Asn Leu Ala Arg Tyr Pro Val  
370 375 380

Lys Pro Gln Pro Tyr Glu Glu Gln Met Arg Ile His Ala Glu Val Ser  
385 390 395 400

Arg Ala Arg His Glu Arg Arg His Ser Asp Val Ser Leu Ala Asn Ala  
405 410 415

Glu Leu Glu Asp Ser Arg Ile Ser Leu Leu Arg Met Asp Arg Pro Ser  
420 425 430

Arg Gln Arg Ser Val Ser Glu Arg Arg Ala Ala Met Glu Asn Gln Arg  
435 440 445

Ser Tyr Ser Met Glu Arg Thr Arg Glu Ala Gln Gly Gln Ser Ser Tyr  
450 455 460

Pro Gln Arg Thr Ser Asn His Ser Pro Pro Thr Pro Arg Arg Ser Pro  
465 470 475 480

Ile Pro Leu Asp Arg Pro Asp Met Arg Arg Ala Asp Ser Leu Arg Lys

485

490

495

Gln His His Leu Asp Pro Ser Ser Ala Val Arg Lys Thr Lys Arg Glu

500

505

510

Lys Met Glu Thr Met Leu Arg Asn Asp Ser Leu Ser Ser Asp Gln Ser

515

520

525

Glu Ser Val Arg Pro Pro Pro Pro Arg Pro His Lys Ser Lys Lys Gly

530

535

540

Gly Lys Met Arg Gln Val Ser Leu Ser Ser Ser Glu Glu Glu Leu Ala

545

550

555

560

Ser Thr Pro Glu Tyr Thr Ser Cys Asp Asp Val Glu Leu Glu Ser Glu

565

570

575

Ser Val Ser Glu Lys Gly Asp Ser Gln Lys Gly Lys Arg Lys Thr Ser

580

585

590

Glu Gln Gly Val Leu Ser Asp Ser Asn Thr Arg Ser Glu Arg Gln Lys

595

600

605

Lys Arg Met Tyr Tyr Gly Gly His Ser Leu Glu Glu Asp Leu Glu Trp

610

615

620

Ser Glu Pro Gln Ile Lys Asp Ser Gly Val Asp Thr Cys Ser Ser Thr

625                      630                      635                      640

Thr Leu Asn Glu Glu His Ser His Ser Asp Lys His Pro Val Thr Trp

645                      650                      655

Gln Pro Ser Lys Asp Gly Asp Arg Leu Ile Gly Arg Ile Leu Leu Asn

660                      665                      670

Lys Arg Leu Lys Asp Gly Ser Val Pro Arg Asp Ser Gly Ala Met Leu

675                      680                      685

Gly Leu Lys Val Val Gly Gly Lys Met Thr Glu Ser Gly Arg Leu Cys

690                      695                      700

Ala Phe Ile Thr Lys Val Lys Lys Gly Ser Leu Ala Asp Thr Val Gly

705                      710                      715                      720

His Leu Arg Pro Gly Asp Glu Val Leu Glu Trp Asn Gly Arg Leu Leu

725                      730                      735

Gln Gly Ala Thr Phe Glu Glu Val Tyr Asn Ile Ile Leu Glu Ser Lys

740                      745                      750

Pro Glu Pro Gln Val Glu Leu Val Val Ser Arg Pro Ile Gly Asp Ile

755                      760                      765

Pro Arg Ile Pro Asp Ser Thr His Ala Gln Leu Glu Ser Ser Ser Ser

770                      775                      780

Ser Phe Glu Ser Gln Lys Met Asp Arg Pro Ser Ile Ser Val Thr Ser  
785 790 795 800

Pro Met Ser Pro Gly Met Leu Arg Asp Val Pro Gln Phe Leu Ser Gly  
805 810 815

Gln Leu Ser Ile Lys Leu Trp Phe Asp Lys Val Gly His Gln Leu Ile  
820 825 830

Val Thr Ile Leu Gly Ala Lys Asp Leu Pro Ser Arg Glu Asp Gly Arg  
835 840 845

Pro Arg Asn Pro Tyr Val Lys Ile Tyr Phe Leu Pro Asp Arg Ser Asp  
850 855 860

Lys Asn Lys Arg Arg Thr Lys Thr Val Lys Lys Thr Leu Glu Pro Lys  
865 870 875 880

Trp Asn Gln Thr Phe Ile Tyr Ser Pro Val His Arg Arg Glu Phe Arg  
885 890 895

Glu Arg Met Leu Glu Ile Thr Leu Trp Asp Gln Ala Arg Val Arg Glu  
900 905 910

Glu Glu Ser Glu Phe Leu Gly Glu Ile Leu Ile Glu Leu Glu Thr Ala  
915 920 925

Leu Leu Asp Asp Glu Pro His Trp Tyr Lys Leu Gln Thr His Asp Val  
930 935 940

Ser Ser Leu Pro Leu Pro Arg Pro Ser Pro Tyr Leu Pro Arg Arg Gln  
945 950 955 960

Leu His Gly Glu Ser Pro Thr Arg Arg Leu Gln Arg Ser Lys Arg Ile  
965 970 975

Ser Asp Ser Glu Val Ser Asp Tyr Asp Cys Glu Asp Gly Val Gly Val  
980 985 990

Val Ser Asp Tyr Arg His Asn Gly Arg Asp Leu Gln Ser Ser Thr Leu  
995 1000 1005

Ser Val Pro Glu Gln Val Met Ser Ser Asn His Cys Ser Pro Ser Gly  
1010 1015 1020

Ser Pro His Arg Val Asp Val Ile Gly Arg Thr Arg Ser Trp Ser Pro  
1025 1030 1035 1040

Ser Ala Pro Pro Pro Gln Arg Asn Val Glu Gln Gly His Arg Gly Thr  
1045 1050 1055

Arg Ala Thr Gly His Tyr Asn Thr Ile Ser Arg Met Asp Arg His Arg  
1060 1065 1070

Val Met Asp Asp His Tyr Ser Ser Asp Arg Asp Arg Asp Cys Glu Ala  
1075 1080 1085

Ala Asp Arg Gln Pro Tyr His Arg Ser Arg Ser Thr Glu Gln Arg Pro



1090	1095	1100
Leu Leu Glu Arg Thr Thr Thr Arg Ser Arg Ser Ser Glu Arg Pro Asp		
1105	1110	1115 1120
Thr Asn Leu Met Arg Ser Met Pro Ser Leu Met Thr Gly Arg Ser Ala		
1125	1130	1135
Pro Pro Ser Pro Ala Leu Ser Arg Ser His Pro Arg Thr Gly Ser Val		
1140	1145	1150
Gln Thr Ser Pro Ser Ser Thr Pro Gly Thr Gly Arg Arg Gly Arg Gln		
1155	1160	1165
Leu Pro Gln Leu Pro Pro Lys Gly Thr Leu Glu Arg Ser Ala Met Asp		
1170	1175	1180
Ile Glu Glu Arg Asn Arg Gln Met Lys Leu Asn Lys Tyr Lys Gln Val		
1185	1190	1195 1200
Ala Gly Ser Asp Pro Arg Leu Glu Gln Asp Tyr His Ser Lys Tyr Arg		
1205	1210	1215
Ser Gly Trp Asp Pro His Arg Gly Ala Asp Thr Val Ser Thr Lys Ser		
1220	1225	1230
Ser Asp Ser Asp Val Ser Asp Val Ser Ala Val Ser Arg Thr Ser Ser		
1235	1240	1245

Ala Ser Arg Phe Ser Ser Thr Ser Tyr Met Ser Val Gln Ser Glu Arg  
1250 1255 1260

Pro Arg Gly Asn Arg Lys Ile Ser Val Phe Thr Ser Lys Met Gln Asn  
1265 1270 1275 1280

Arg Gln Met Gly Val Ser Gly Lys Asn Leu Thr Lys Ser Thr Ser Ile  
1285 1290 1295

Ser Gly Asp Met Cys Ser Leu Glu Lys Asn Asp Gly Ser Gln Ser Asp  
1300 1305 1310

Thr Ala Val Gly Ala Leu Gly Thr Ser Gly Lys Lys Arg Arg Ser Ser  
1315 1320 1325

Ile Gly Ala Lys Met Val Ala Ile Val Gly Leu Ser Arg Lys Ser Arg  
1330 1335 1340

Ser Ala Ser Gln Leu Ser Gln Thr Glu Gly Gly Gly Lys Lys Leu Arg  
1345 1350 1355 1360

Ser Thr Val Gln Arg Ser Thr Glu Thr Gly Leu Ala Val Glu Met Arg  
1365 1370 1375

Asn Trp Met Thr Arg Gln Ala Ser Arg Glu Ser Thr Asp Gly Ser Met  
1380 1385 1390

Asn Ser Tyr Ser Ser Glu Gly Asn Leu Ile Phe Pro Gly Val Arg Leu  
1395 1400 1405

Ala Ser Asp Ser Gln Phe Ser Asp Phe Leu Asp Gly Leu Gly Pro Ala

1410

1415

1420

Gln Leu Val Gly Arg Gln Thr Leu Ala Thr Pro Ala Met Gly Asp Ile

1425

1430

1435

1440

Gln Val Gly Met Met Asp Lys Lys Gly Gln Leu Glu Val Glu Ile Ile

1445

1450

1455

Arg Ala Arg Gly Leu Val Val Lys Pro Gly Ser Lys Thr Leu Pro Ala

1460

1465

1470

Pro Tyr Val Lys Val Tyr Leu Leu Asp Asn Gly Val Cys Ile Ala Lys

1475

1780

1485

Lys Lys Thr Lys Val Ala Arg Lys Thr Leu Glu Pro Leu Tyr Gln Gln

1490

1495

1500

Leu Leu Ser Phe Glu Glu Ser Pro Gln Gly Arg Val Leu Gln Ile Ile

1505

1510

1515

1520

Val Trp Gly Asp Tyr Gly Arg Met Asp His Lys Ser Phe Met Gly Val

1525

1530

1535

Ala Gln Ile Leu Leu Asp Glu Leu Glu Leu Ser Asn Met Val Ile Gly

1540

1545

1550

Trp Phe Lys Leu Phe Pro Pro Ser Ser Leu Val Asp Pro Thr Ser Ala

1555

1560

1565

Pro Leu Thr Arg Arg Ala Ser Gln Ser Ser Leu Glu Ser Ser Thr Gly

1570

1575

1580

Pro Ser Tyr Ser Arg Ser

1585

1590

<210> 2

<211> 4980

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 2

gcttccctag ggtgggttcgg ctccgccaaa c atg tcg gct ccg ctc ggg ccc 52

Met Ser Ala Pro Leu Gly Pro

1

5

cgg ggc cgc ccg gct ccc acc ccg gcg gcc tct caa cct cct ccg cag 100

Arg Gly Arg Pro Ala Pro Thr Pro Ala Ala Ser Gln Pro Pro Pro Gln

10

15

20

ccc gag atg ccg gac ctc agc cac ctc acg gaa gag gag agg aaa atc 148

Pro Glu Met Pro Asp Leu Ser His Leu Thr Glu Glu Glu Arg Lys Ile

25

30

35

atc ctg gct gtc atg gat cgt cag aag aaa gaa gag gag aag gag cag 196

Ile Leu Ala Val Met Asp Arg Gln Lys Lys Glu Glu Glu Lys Glu Gln

40

45

50

55

tcc gtg ctc aag atc aaa gaa gaa cac aaa gca caa ccg aca cag tgg 244

Ser Val Leu Lys Ile Lys Glu Glu His Lys Ala Gln Pro Thr Gln Trp

60

65

70

ttt ccc ttt agt ggg atc act gaa ctg gta aat aac gtt ctg cag ccc 292

Phe Pro Phe Ser Gly Ile Thr Glu Leu Val Asn Asn Val Leu Gln Pro

75

80

85

cag caa aaa caa ccc aat gag aag gag ccc cag aca aag ctg cac caa 340

Gln Gln Lys Gln Pro Asn Glu Lys Glu Pro Gln Thr Lys Leu His Gln

90

95

100

caa ttt gaa atg tat aag gag caa gtc aag aag atg gga gag gaa tcg 388

Gln Phe Glu Met Tyr Lys Glu Gln Val Lys Lys Met Gly Glu Glu Ser

105

110

115

cag cag cag caa gag cag aag ggt gat gcc ccg acc tgt ggc atc tgc 436

Gln Gln Gln Gln Glu Gln Lys Gly Asp Ala Pro Thr Cys Gly Ile Cys

120

125

130

135

cac aag aca aaa ttt gca gat gga tgc ggc cat aat tgt tcc tat tgc 484

His Lys Thr Lys Phe Ala Asp Gly Cys Gly His Asn Cys Ser Tyr Cys

140

145

150

caa acc aag ttc tgt gct cga tgt gga ggt cga gtg tct tta cgc tca 532

Gln Thr Lys Phe Cys Ala Arg Cys Gly Gly Arg Val Ser Leu Arg Ser

155

160

165

aac aag gtt atg tgg gtg tgt aat ttg tgc cga aaa caa caa gaa atc 580  
 Asn Lys Val Met Trp Val Cys Asn Leu Cys Arg Lys Gln Gln Glu Ile  
 170 175 180

ctc act aaa tca gga gca tgg ttt tat aat agt ggg tct aac aca ctg 628  
 Leu Thr Lys Ser Gly Ala Trp Phe Tyr Asn Ser Gly Ser Asn Thr Leu  
 185 190 195

cag caa cct gat caa aag gtt cct cga ggg ctt cga aat gag gaa gcc 676  
 Gln Gln Pro Asp Gln Lys Val Pro Arg Gly Leu Arg Asn Glu Glu Ala  
 200 205 210 215

cct cag gag aag aaa gca aaa cta cac gag cag ccc cag ttc caa gga 724  
 Pro Gln Glu Lys Lys Ala Lys Leu His Glu Gln Pro Gln Phe Gln Gly  
 220 225 230

gcc cca ggt gac tta tca gta cct gca gtt gag aaa ggc cga gct cat 772  
 Ala Pro Gly Asp Leu Ser Val Pro Ala Val Glu Lys Gly Arg Ala His  
 235 240 245

ggg ctc aca aga cag gat act att aaa aat gga tca gga gtg aag cac 820  
 Gly Leu Thr Arg Gln Asp Thr Ile Lys Asn Gly Ser Gly Val Lys His  
 250 255 260

cag att gcc agt gac atg cct tca gac aga aaa cga agt cca tca gtg 868  
 Gln Ile Ala Ser Asp Met Pro Ser Asp Arg Lys Arg Ser Pro Ser Val  
 265 270 275

tcc agg gat caa aat cga aga tac gag caa agt gaa gaa aga gag gac 916

Ser Arg Asp Gln Asn Arg Arg Tyr Glu Gln Ser Glu Glu Arg Glu Asp

280 285 290 295

tac tca cag tat gtt cct tca gat ggt aca atg cca aga tct cct tcg 964

Tyr Ser Gln Tyr Val Pro Ser Asp Gly Thr Met Pro Arg Ser Pro Ser

300 305 310

gat tat gct gat aga cga tct cag cgt gag cct caa ttt tat gaa gaa 1012

Asp Tyr Ala Asp Arg Arg Ser Gln Arg Glu Pro Gln Phe Tyr Glu Glu

315 320 325

cct ggt cat tta aat tac agg gat tct aac agg aga ggc cat aga cat 1060

Pro Gly His Leu Asn Tyr Arg Asp Ser Asn Arg Arg Gly His Arg His

330 335 340

tcc aaa gag tat att gtg gat gat gaa gat gtg gag agc aga gat gaa 1108

Ser Lys Glu Tyr Ile Val Asp Asp Glu Asp Val Glu Ser Arg Asp Glu

345 350 355

tat gaa aga caa agg aga gag gag gaa tac cag gca cgc tac aga agt 1156

Tyr Glu Arg Gln Arg Arg Glu Glu Glu Tyr Gln Ala Arg Tyr Arg Ser

360 365 370 375

gat cca aat ctg gcc cgg tat ccc gta aag cca caa ccc tac gaa gaa 1204

Asp Pro Asn Leu Ala Arg Tyr Pro Val Lys Pro Gln Pro Tyr Glu Glu

380 385 390

caa atg cgc atc cac gct gag gtg tcc agg gca cga cat gag aga agg 1252

Gln Met Arg Ile His Ala Glu Val Ser Arg Ala Arg His Glu Arg Arg

395	400	405	
cac agt gat gtt tct ttg gca aac gct gaa cta gaa gat tcc agg att			1300
His Ser Asp Val Ser Leu Ala Asn Ala Glu Leu Glu Asp Ser Arg Ile			
410	415	420	
tct ctg cta agg atg gat aga cca tca agg caa aga tct gta tct gaa			1348
Ser Leu Leu Arg Met Asp Arg Pro Ser Arg Gln Arg Ser Val Ser Glu			
425	430	435	
cgt aga gct gca atg gaa aac caa cga tcg tat tca atg gaa aga act			1396
Arg Arg Ala Ala Met Glu Asn Gln Arg Ser Tyr Ser Met Glu Arg Thr			
440	445	450	455
cga gag gct cag gga caa agt tct tat cca caa agg acc tca aat cat			1444
Arg Glu Ala Gln Gly Gln Ser Ser Tyr Pro Gln Arg Thr Ser Asn His			
460	465	470	
agt cct ccc acc cct cgg cgg agc cct ata ccg ctt gat aga cca gac			1492
Ser Pro Pro Thr Pro Arg Arg Ser Pro Ile Pro Leu Asp Arg Pro Asp			
475	480	485	
atg agg cgc gct gac tcc cta cgg aaa cag cac cac tta gat ccc agc			1540
Met Arg Arg Ala Asp Ser Leu Arg Lys Gln His His Leu Asp Pro Ser			
490	495	500	
tct gct gtg agg aaa acg aag cga gaa aaa atg gaa acc atg tta agg			1588
Ser Ala Val Arg Lys Thr Lys Arg Glu Lys Met Glu Thr Met Leu Arg			
505	510	515	



aat gat tct ttg agt tca gac cag tcc gag tca gtg agg ccg ccc cca 1636

Asn Asp Ser Leu Ser Ser Asp Gln Ser Glu Ser Val Arg Pro Pro Pro

520 525 530 535

cca agg cct cat aaa tcc aag aaa gga ggt aaa atg cgc cag gtt tca 1684

Pro Arg Pro His Lys Ser Lys Lys Gly Gly Lys Met Arg Gln Val Ser

540 545 550

ctg agc agc tcg gag gag gag ctg gca tcc aca cct gag tat aca agc 1732

Leu Ser Ser Ser Glu Glu Glu Leu Ala Ser Thr Pro Glu Tyr Thr Ser

555 560 565

tgt gat gat gtg gag ctg gaa agc gag agt gtg agt gag aaa ggg gac 1780

Cys Asp Asp Val Glu Leu Glu Ser Glu Ser Val Ser Glu Lys Gly Asp

570 575 580

agt caa aag gga aaa aga aaa act agt gag cag gga gtt ttg tcg gat 1828

Ser Gln Lys Gly Lys Arg Lys Thr Ser Glu Gln Gly Val Leu Ser Asp

585 590 595

tct aac acc agg tct gag aga caa aag aaa agg atg tac tat ggt ggc 1876

Ser Asn Thr Arg Ser Glu Arg Gln Lys Lys Arg Met Tyr Tyr Gly Gly

600 605 610 615

cac tct ttg gaa gag gat ttg gaa tgg tct gag cct cag att aag gac 1924

His Ser Leu Glu Glu Asp Leu Glu Trp Ser Glu Pro Gln Ile Lys Asp

620 625 630

tct ggg gta gat acc tgt agt agc aca acc ctt aac gag gag cat agc 1972  
 Ser Gly Val Asp Thr Cys Ser Ser Thr Thr Leu Asn Glu Glu His Ser  
 635 640 645

cat agt gat aag cac cct gtg acc tgg cag cca tcc aaa gat gga gat 2020  
 His Ser Asp Lys His Pro Val Thr Trp Gln Pro Ser Lys Asp Gly Asp  
 650 655 660

cgc cta att ggt cgt att tta tta aat aag cgt tta aaa gat ggg agt 2068  
 Arg Leu Ile Gly Arg Ile Leu Leu Asn Lys Arg Leu Lys Asp Gly Ser  
 665 670 675

gta cct cga gac tca gga gca atg ctg ggc tta aag gtt gta gga gga 2116  
 Val Pro Arg Asp Ser Gly Ala Met Leu Gly Leu Lys Val Val Gly Gly  
 680 685 690 695

aag atg act gaa tca ggt cga ctt tgt gca ttt att acc aaa gta aaa 2164  
 Lys Met Thr Glu Ser Gly Arg Leu Cys Ala Phe Ile Thr Lys Val Lys  
 700 705 710

aaa gga agt tta gct gat act gta gga cat ctt aga cca ggt gat gaa 2212  
 Lys Gly Ser Leu Ala Asp Thr Val Gly His Leu Arg Pro Gly Asp Glu  
 715 720 725

gtc ttg gaa tgg aat ggg agg cta ttg caa gga gcc aca ttt gag gaa 2260  
 Val Leu Glu Trp Asn Gly Arg Leu Leu Gln Gly Ala Thr Phe Glu Glu  
 730 735 740

gtt tac aac att att cta gaa tcc aaa cct gaa cca caa gtt gag ctt 2308

Val Tyr Asn Ile Ile Leu Glu Ser Lys Pro Glu Pro Gln Val Glu Leu

745

750

755

gtt gtt tca agg cca att gga gat att cct aga ata cct gat agc acg 2356

Val Val Ser Arg Pro Ile Gly Asp Ile Pro Arg Ile Pro Asp Ser Thr

760

765

770

775

cat gca caa ctg gaa tcc agt tct agc tca ttt gaa tct caa aaa atg 2404

His Ala Gln Leu Glu Ser Ser Ser Ser Ser Phe Glu Ser Gln Lys Met

780

785

790

gac cgt cct tct ata tcc gtt acc tca ccc atg agt cct ggc atg ctg 2452

Asp Arg Pro Ser Ile Ser Val Thr Ser Pro Met Ser Pro Gly Met Leu

795

800

805

agg gat gtc ccg cag ttc tta tct gga cag ctt tca ata aaa cta tgg 2500

Arg Asp Val Pro Gln Phe Leu Ser Gly Gln Leu Ser Ile Lys Leu Trp

810

815

820

ttt gac aag gtt ggt cac cag ttg ata gtt aca att ttg gga gca aag 2548

Phe Asp Lys Val Gly His Gln Leu Ile Val Thr Ile Leu Gly Ala Lys

825

830

835

gat ctc cct tcc agg gaa gat ggg agg cca agg aat cct tat gtt aag 2596

Asp Leu Pro Ser Arg Glu Asp Gly Arg Pro Arg Asn Pro Tyr Val Lys

840

845

850

855

att tac ttc ctt cca gat aga agt gat aaa aat aag aga aga aca aaa 2644

Ile Tyr Phe Leu Pro Asp Arg Ser Asp Lys Asn Lys Arg Arg Thr Lys

860	865	870	
aca gtc aag aaa act ttg gaa ccc aaa tgg aac cag act ttc att tat			2692
Thr Val Lys Lys Thr Leu Glu Pro Lys Trp Asn Gln Thr Phe Ile Tyr			
875	880	885	
tct cct gtc cac cga aga gaa ttc cgt gaa cga atg ctg gaa att acc			2740
Ser Pro Val His Arg Arg Glu Phe Arg Glu Arg Met Leu Glu Ile Thr			
890	895	900	
ctt tgg gat caa gct aga gtt cga gaa gaa gag agc gaa ttc tta gga			2788
Leu Trp Asp Gln Ala Arg Val Arg Glu Glu Glu Ser Glu Phe Leu Gly			
905	910	915	
gag att tta att gaa ttg gaa aca gct ttg cta gat gat gag ccg cac			2836
Glu Ile Leu Ile Glu Leu Glu Thr Ala Leu Leu Asp Asp Glu Pro His			
920	925	930	935
tgg tat aag ctg cag acc cat gat gtc tcc tca ttg cca ctc cct cgc			2884
Trp Tyr Lys Leu Gln Thr His Asp Val Ser Ser Leu Pro Leu Pro Arg			
940	945	950	
cct tcc cca tat ctg ccc cgg agg cag ctc cat gga gag agc cca acg			2932
Pro Ser Pro Tyr Leu Pro Arg Arg Gln Leu His Gly Glu Ser Pro Thr			
955	960	965	
cgc agg ctg caa agg tcg aag aga ata agt gac agt gaa gtg tct gac			2980
Arg Arg Leu Gln Arg Ser Lys Arg Ile Ser Asp Ser Glu Val Ser Asp			
970	975	980	

tac gac tgc gag gat ggc gtg gga gta gtg tca gat tat cga cac aat 3028

Tyr Asp Cys Glu Asp Gly Val Gly Val Val Ser Asp Tyr Arg His Asn

985

990

995

ggc cgc gat ctt caa agc tcc acg ttg tcg gtg cca gaa caa gtc atg 3076

Gly Arg Asp Leu Gln Ser Ser Thr Leu Ser Val Pro Glu Gln Val Met

1000

1005

1010

1015

tca tca aat cat tgc tca cca tca ggg tct cct cat cga gta gat gtt 3124

Ser Ser Asn His Cys Ser Pro Ser Gly Ser Pro His Arg Val Asp Val

1020

1025

1030

ata gga agg aca agg tca tgg tcg cct agt gcc cct cct cct caa agg 3172

Ile Gly Arg Thr Arg Ser Trp Ser Pro Ser Ala Pro Pro Pro Gln Arg

1035

1040

1045

aat gtg gaa cag ggg cac cga ggg aca cgt gct act ggc cat tac aac 3220

Asn Val Glu Gln Gly His Arg Gly Thr Arg Ala Thr Gly His Tyr Asn

1050

1055

1060

aca att agc cga atg gat aga cac cgt gtc atg gat gac cac tac tct 3268

Thr Ile Ser Arg Met Asp Arg His Arg Val Met Asp Asp His Tyr Ser

1065

1070

1075

tca gat aga gac agg gat tgt gaa gca gca gat aga cag cca tat cac 3316

Ser Asp Arg Asp Arg Asp Cys Glu Ala Ala Asp Arg Gln Pro Tyr His

1080

1085

1090

1095

aga tcc aga tca aca gaa caa cgg cct ctc cta gag cgg acc acc acc 3364  
 Arg Ser Arg Ser Thr Glu Gln Arg Pro Leu Leu Glu Arg Thr Thr Thr  
 1100 1105 1110

cgc tcc aga tcc tct gaa cgt cct gat aca aac ctc atg agg tcg atg 3412  
 Arg Ser Arg Ser Ser Glu Arg Pro Asp Thr Asn Leu Met Arg Ser Met  
 1115 1120 1125

cct tca tta atg act gga aga tct gcc cct cct tca cct gcc tta tcg 3460  
 Pro Ser Leu Met Thr Gly Arg Ser Ala Pro Pro Ser Pro Ala Leu Ser  
 1130 1135 1140

agg tct cac cct cgt acc ggg tct gtc cag aca agc cca tca agt act 3508  
 Arg Ser His Pro Arg Thr Gly Ser Val Gln Thr Ser Pro Ser Ser Thr  
 1145 1150 1155

ccg gga aca gga cga agg ggc cga cag ctt cca cag ctt cca cca aag 3556  
 Pro Gly Thr Gly Arg Arg Gly Arg Gln Leu Pro Gln Leu Pro Pro Lys  
 1160 1165 1170 1175

gga aca ttg gag aga agt gct atg gat ata gag gag aga aat cgc caa 3604  
 Gly Thr Leu Glu Arg Ser Ala Met Asp Ile Glu Glu Arg Asn Arg Gln  
 1180 1185 1190

atg aaa ctt aac aaa tac aaa cag gta gcc gga tca gac ccc aga ctg 3652  
 Met Lys Leu Asn Lys Tyr Lys Gln Val Ala Gly Ser Asp Pro Arg Leu  
 1195 1200 1205

gag caa gat tac cat tcg aag tat cgc tca gga tgg gat cca cat aga 3700

Glu Gln Asp Tyr His Ser Lys Tyr Arg Ser Gly Trp Asp Pro His Arg

1210

1215

1220

ggg gca gat act gtt tcc act aaa tcc tcg gac agt gat gta agt gat 3748

Gly Ala Asp Thr Val Ser Thr Lys Ser Ser Asp Ser Asp Val Ser Asp

1225

1230

1235

gta tct gcg gtt tca agg act agt agt gct tct cgt ttc agc agc aca 3796

Val Ser Ala Val Ser Arg Thr Ser Ser Ala Ser Arg Phe Ser Ser Thr

1240

1245

1250

1255

agc tac atg tcc gtc caa tca gag cgg ccg aga gga aac agg aaa atc 3844

Ser Tyr Met Ser Val Gln Ser Glu Arg Pro Arg Gly Asn Arg Lys Ile

1260

1265

1270

agt gtc ttt aca tcc aaa atg caa aac aga cag atg ggc gtg tcg ggg 3892

Ser Val Phe Thr Ser Lys Met Gln Asn Arg Gln Met Gly Val Ser Gly

1275

1280

1285

aag aac ttg acc aaa agc acc agc atc agt gga gac atg tgc tca ctg 3940

Lys Asn Leu Thr Lys Ser Thr Ser Ile Ser Gly Asp Met Cys Ser Leu

1290

1295

1300

gag aag aat gac ggc agc cag tcc gac act gca gtg ggc gcc ctg ggt 3988

Glu Lys Asn Asp Gly Ser Gln Ser Asp Thr Ala Val Gly Ala Leu Gly

1305

1310

1315

acc agt ggc aag aag cgg cga tct agc att ggg gcc aaa atg gta gct 4036

Thr Ser Gly Lys Lys Arg Arg Ser Ser Ile Gly Ala Lys Met Val Ala

1320	1325	1330	1335	
att gtt ggt ctc tca cgg aaa agt cgc agt gcc tct caa ctc agc caa				4084
Ile Val Gly Leu Ser Arg Lys Ser Arg Ser Ala Ser Gln Leu Ser Gln				
	1340	1345	1350	
acc gaa gga gga ggt aaa aag cta cgg agc act gtt cag aga agc acg				4132
Thr Glu Gly Gly Gly Lys Lys Leu Arg Ser Thr Val Gln Arg Ser Thr				
	1355	1360	1365	
gag acc ggg cta gca gtg gag atg agg aac tgg atg acc cgc cag gcc				4180
Glu Thr Gly Leu Ala Val Glu Met Arg Asn Trp Met Thr Arg Gln Ala				
	1370	1375	1380	
agc cgg gaa tcc aca gat ggc agc atg aac agc tat agc tcg gaa gga				4228
Ser Arg Glu Ser Thr Asp Gly Ser Met Asn Ser Tyr Ser Ser Glu Gly				
	1385	1390	1395	
aat ctg atc ttc cct ggg gtc cgc ctg gcc tct gac agc cag ttc agt				4276
Asn Leu Ile Phe Pro Gly Val Arg Leu Ala Ser Asp Ser Gln Phe Ser				
1400	1405	1410	1415	
gat ttc ctg gat ggc ctg ggc cct gct cag cta gtg gga cgc cag acc				4324
Asp Phe Leu Asp Gly Leu Gly Pro Ala Gln Leu Val Gly Arg Gln Thr				
	1420	1425	1430	
ctg gct act cct gca atg ggt gac att cag gtg gga atg atg gat aaa				4372
Leu Ala Thr Pro Ala Met Gly Asp Ile Gln Val Gly Met Met Asp Lys				
	1435	1440	1445	



aag gga cag ctg gag gta gaa atc atc cgg gcg cgc ggc ctt gtg gta 4420

Lys Gly Gln Leu Glu Val Glu Ile Ile Arg Ala Arg Gly Leu Val Val

1450

1455

1460

aaa cca ggt tcc aag aca ctg cca gca ccg tat gtc aag gtg tat ctg 4468

Lys Pro Gly Ser Lys Thr Leu Pro Ala Pro Tyr Val Lys Val Tyr Leu

1465

1470

1475

tta gac aac gga gtc tgc ata gcc aaa aag aaa acc aag gtg gcg aga 4516

Leu Asp Asn Gly Val Cys Ile Ala Lys Lys Lys Thr Lys Val Ala Arg

1780

1485

1490

1495

aag acc ctg gag ccc ctg tac cag cag ctc ttg tcc ttc gag gag agc 4564

Lys Thr Leu Glu Pro Leu Tyr Gln Gln Leu Leu Ser Phe Glu Glu Ser

1500

1505

1510

ccc cag ggg agg gtg tta cag atc att gtc tgg gga gat tat ggt cgt 4612

Pro Gln Gly Arg Val Leu Gln Ile Ile Val Trp Gly Asp Tyr Gly Arg

1515

1520

1525

atg gat cac aaa tcc ttt atg gga gtg gcc cag ata ctc tta gat gaa 4660

Met Asp His Lys Ser Phe Met Gly Val Ala Gln Ile Leu Leu Asp Glu

1530

1535

1540

ctg gaa cta tcc aac atg gtg att gga tgg ttc aaa ctc ttc cct cct 4708

Leu Glu Leu Ser Asn Met Val Ile Gly Trp Phe Lys Leu Phe Pro Pro

1545

1550

1555

tcc tcc cta gta gat cca acc tcg gca cct ctg aca aga aga gct tcc 4756  
 Ser Ser Leu Val Asp Pro Thr Ser Ala Pro Leu Thr Arg Arg Ala Ser  
 1560 1565 1570 1575

caa tcg tct ctg gaa agt tct acc gga cct tct tac tct cgt tca 4801  
 Gln Ser Ser Leu Glu Ser Ser Thr Gly Pro Ser Tyr Ser Arg Ser  
 1580 1585 1590

tagcaactat aaaactgttg tcacaacaac cagcgatata aaaaccagaa gaaaacgcac 4861

aggtggaagc ccctggtaac actgcatgct tgatgttgtg tctacagagc ccacgtctag 4921

ggataccaag cagtcctgtg ttctcagagg aagtcgtaca cattgtgccc tagcaaagg 4980

<210> 3

<211> 45

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 3

ttgcgctcactcttctggcctcccttgccattctgctctgaaagc 45

<210> 4

<211> 16

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 4

acctacgtgactacgt 16

【図面の簡単な説明】

- 【図 1】 cAMP 結合ドメインの配列比較図。
- 【図 2】 cAMP-A への cAMP の結合を示すグラフ。
- 【図 3】 Rim1 及び Rim2 の間での、ジンクフィンガー、PDZ、及び C2 ドメインのアミノ酸同一性比較。
- 【図 4】 cAMP-GEFII と Rim1 又は Rim2 との相互作用を示すイムノブロッティング。
- 【図 5】 ラットの各組織中並びに内分泌細胞及び神経内分泌細胞由来細胞経における cAMP-GEFII、Rim1、及び Rim2 のノーザンブロット分析。
- 【図 6】 マウス脳及び下垂体における Rim1 及び Rim2 の所在を示す in situ ハイブリダイゼーション。
- 【図 7】 酵母ツーハイブリッドアッセイの結果を示すグラフ。
- 【図 8】 in vitro での Rab3A 及び Rim1 又は Rim2 の相互作用を示すイムノブロッティング。
- 【図 9】 GH 及び cAMP-GEFII で共トランスフェクトした PC12 細胞からの高  $K^+$  誘導 GH 分泌の時間的推移を示すグラフ。
- 【図 10】 トランスフェクト PC12 細胞からの GH 分泌に対するフォルスコリンの影響を示すグラフ。
- 【図 11】 種々の変異 cAMP-GEFII でトランスフェクトした PC12 細胞からのフォルスコリン誘導 GH 分泌を示すグラフ。
- 【図 12】 cAMP-GEFII でトランスフェクトした PC12 細胞からのフォルスコリン誘導 GH 分泌に対する H-89 の影響を示すグラフ。
- 【図 13】 cAMP 依存性エキソサイトーシスのモデルを示す概念図。

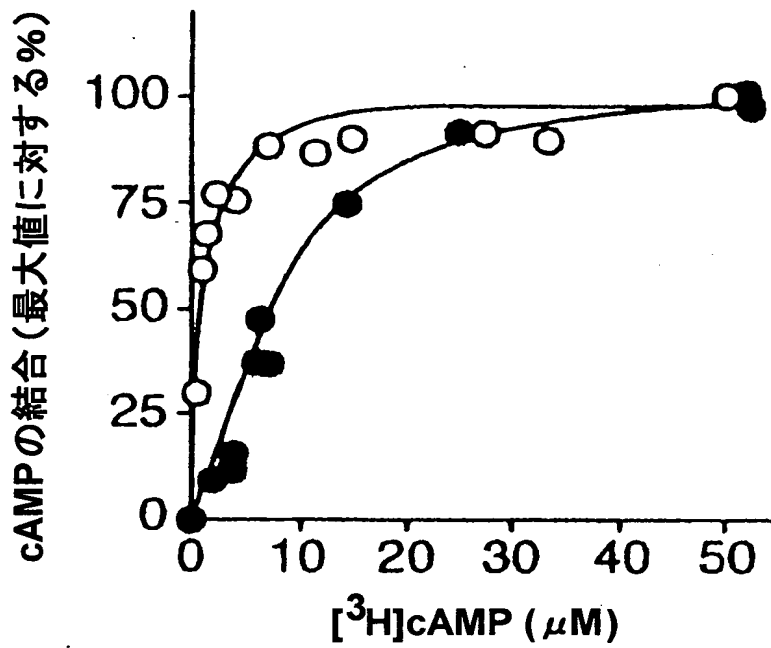
【書類名】

図面

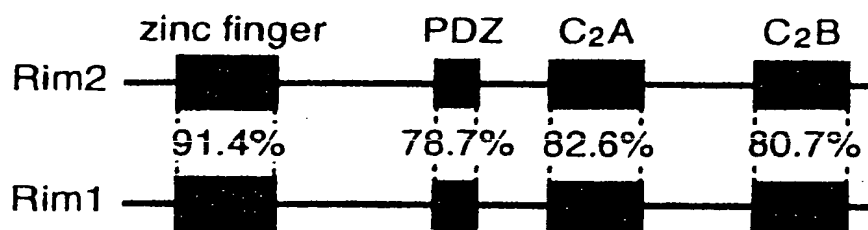
【図 1】

CAMP-A Q DICTNWAYVLA SLDVKVSETSSHQDAVTICTLGIGTAF SIL-DNTPH TIVTR 130  
CAMP-B Q EEGTSWYIILK SVN-VIYKG----V-VCTLHEGDDF KLALVNDAP A SIVLR 439  
RI α-A Q DEGDNPFYVIDQ EMDVVVNNEWAT-----SVGEGGSP LALIYGTP A TVKAK 218  
RI α-B Q EPGDEFFIILE TAAV-LQRRSENEEFVEVGRGLGPSDYF IALLMNRPA TVVAR 342

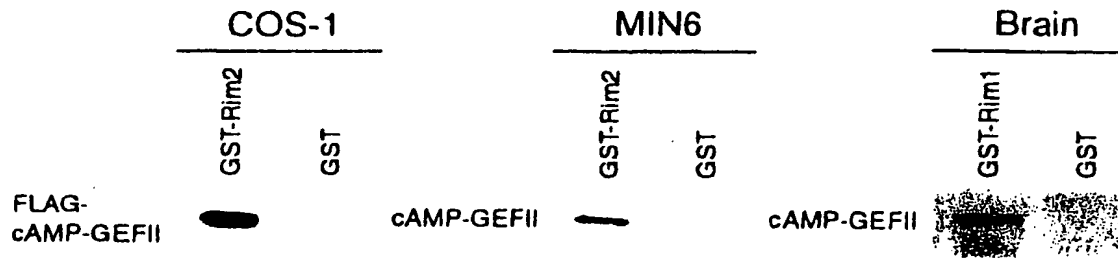
【図 2】



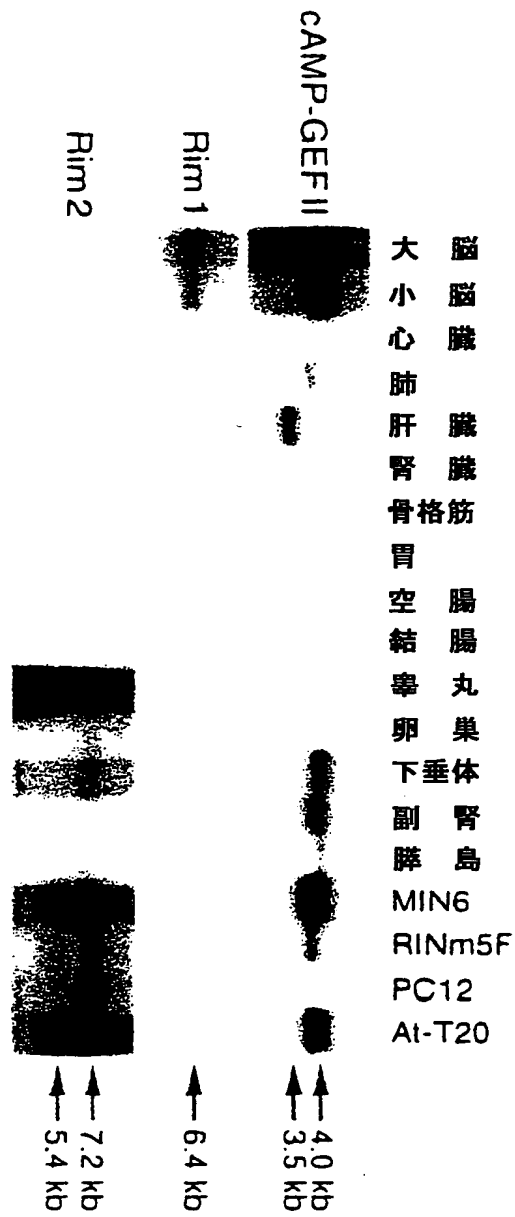
【図 3】



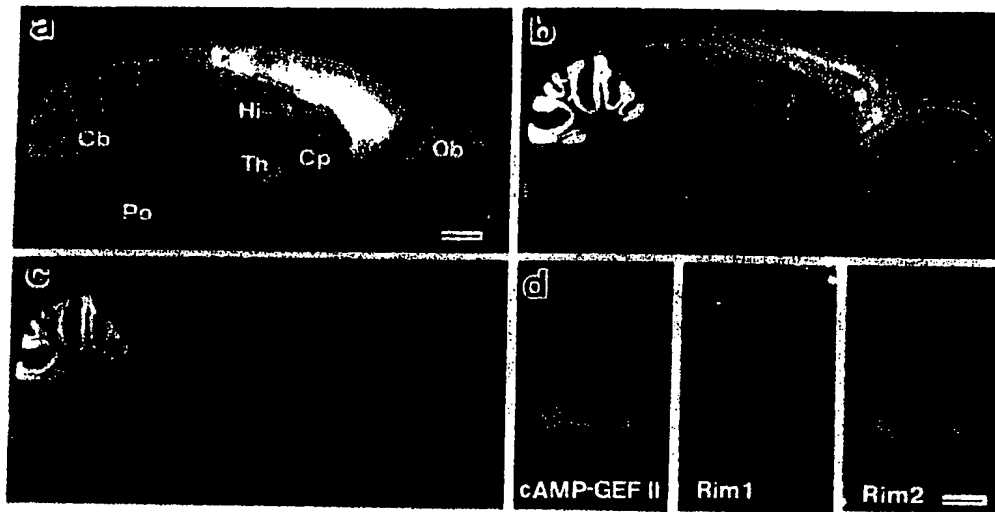
【図 4】



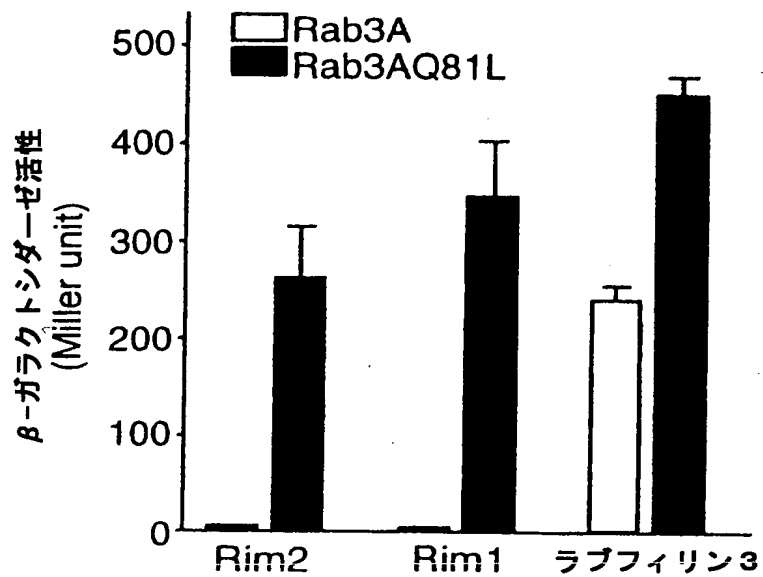
【图 5】



【図 6】





【図 7】

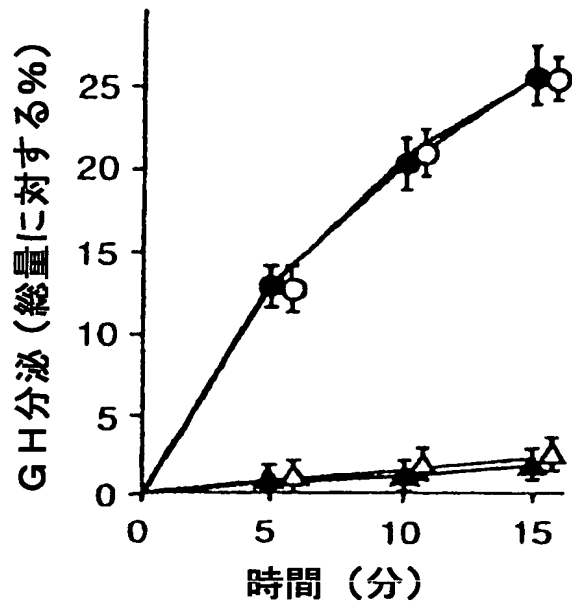




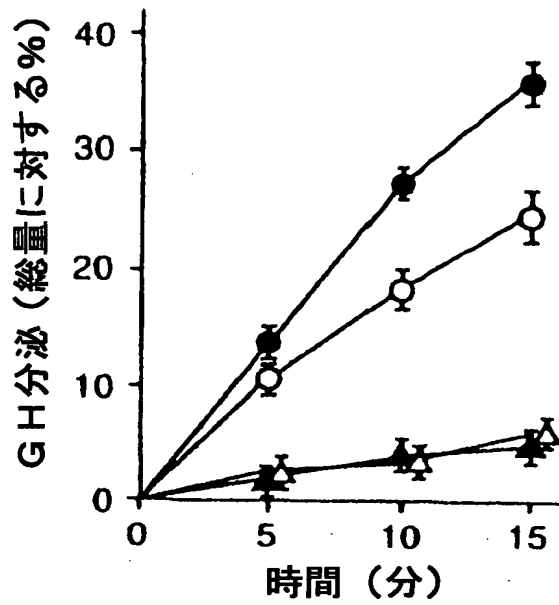
【図 8】

	Rim2		Rim1	
GDP $\beta$ S	+	-	+	-
GTP $\gamma$ S	-	+	-	+
Rab3A				

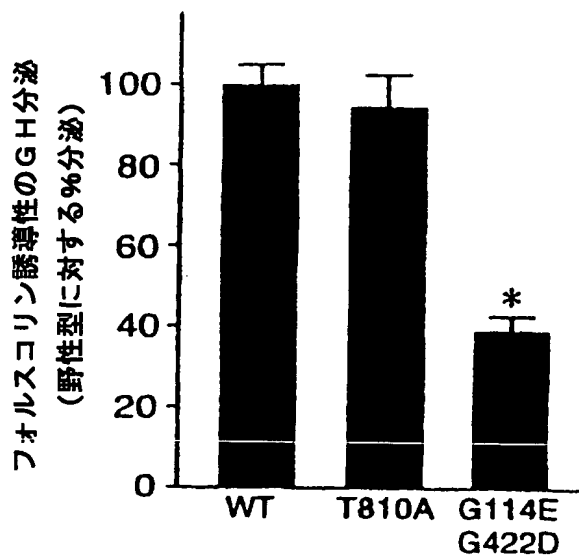
【図 9】



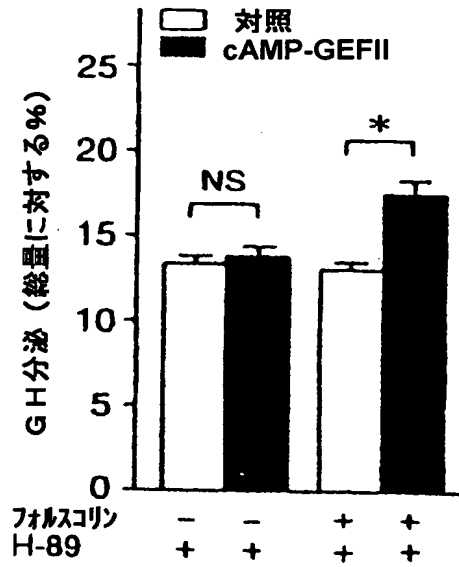
【図 10】



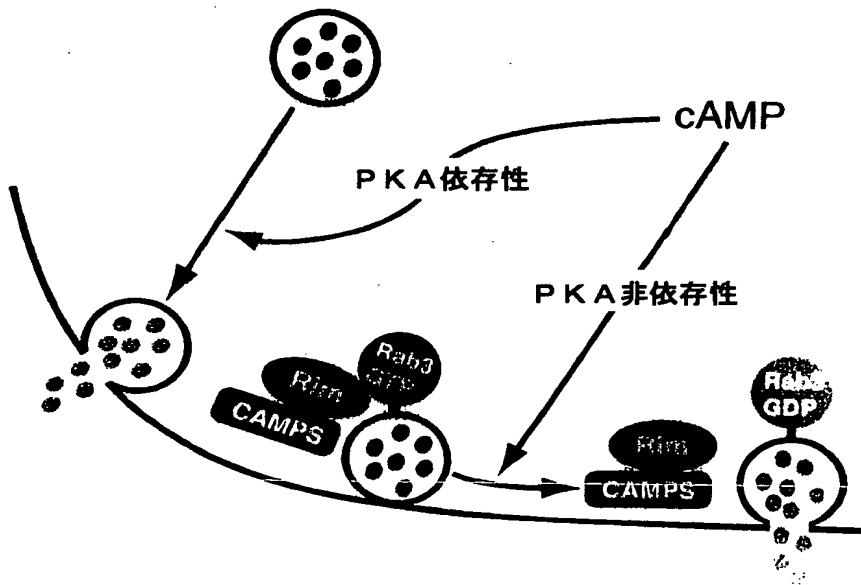
【図 11】



【図 12】



【図 13】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 細胞内小胞輸送系の機能の解明に役立ち該輸送系が関与する神経細胞や分泌系細胞に関係した疾患の治療薬の開発に利用できるタンパク質を提供する。

【解決手段】 配列表の配列番号 1 に示したアミノ酸配列において 1 個又は複数のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質であって、GDP/GTP 交換反応制御因子 II と相互作用する性質を有するタンパク質。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	平成11年 特許願 第288372号
受付番号	59900990615
書類名	特許願
担当官	喜多川 哲次 1804
作成日	平成11年11月 2日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成11年10月 8日
【特許出願人】	
【識別番号】	595145094
【住所又は居所】	千葉県千葉市中央区千葉寺町638-1 青葉の森の街22-1-4
【氏名又は名称】	清野 進
【代理人】	申請人
【識別番号】	100104639
【住所又は居所】	大阪市中央区北浜2丁目5番13号 北浜平和ビル2階 早坂国際特許事務所
【氏名又は名称】	早坂 巧

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [595145094]

1. 変更年月日 1998年12月14日

[変更理由] 住所変更

住 所 千葉県千葉市中央区千葉寺町638-1 青葉の森の街22-  
1-4

氏 名 清野 進

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000228545]

1. 変更年月日 1994年11月30日  
[変更理由] 住所変更  
住 所 兵庫県芦屋市春日町3番19号  
氏 名 日本ケミカルリサーチ株式会社